

学校编码: 10384

密级

学号: 22620060153351

廈門大學

博 士 学 位 论 文

两种硬骨鱼抗菌肽 Hecpcidin 的基因工程
表达与条件优化、抗菌特性比较及其抗菌机
理研究

Recombinant Production, Antimicrobial Activity Analysis
and Antimicrobial Mechanism of Hecpcidin from marine fish
Pseudosciaena crocea、*Oryzias melastigma*

蔡晶晶

指导教师姓名 王克坚 教授

专 业 名 称 环 境 科 学

论文提交日期 2010年6月

论文答辩时间 2010年6月

2010年6月

厦门大学学位论文原创性声明

本人呈交的学位论文是本人在导师指导下,独立完成的研究成果。本人在论文写作中参考其他个人或集体已经发表的研究成果,均在文中以适当方式明确标明,并符合法律规范和《厦门大学研究生学术活动规范(试行)》。

另外,该学位论文为()课题(组)的研究成果,获得()课题(组)经费或实验室的资助,在()实验室完成。(请在以上括号内填写课题或课题组负责人或实验室名称,未有此项声明内容的,可以不作特别声明。)

声明人(签名):

年 月 日

厦门大学学位论文著作权使用声明

本人同意厦门大学根据《中华人民共和国学位条例暂行实施办法》等规定保留和使用此学位论文，并向主管部门或其指定机构送交学位论文（包括纸质版和电子版），允许学位论文进入厦门大学图书馆及其数据库被查阅、借阅。本人同意厦门大学将学位论文加入全国博士、硕士学位论文共建单位数据库进行检索，将学位论文的标题和摘要汇编出版，采用影印、缩印或者其它方式合理复制学位论文。

本学位论文属于：

（ ） 1. 经厦门大学保密委员会审查核定的保密学位论文，
于 年 月 日解密，解密后适用上述授权。

（ ） 2. 不保密，适用上述授权。

（请在以上相应括号内打“√”或填上相应内容。保密学位论文应是已经厦门大学保密委员会审定过的学位论文，未经厦门大学保密委员会审定的学位论文均为公开学位论文。此声明栏不填写的，默认为公开学位论文，均适用上述授权。）

声明人（签名）：

年 月 日

目 录

缩略词中英文对照表.....	-1-
中文摘要.....	I
英文摘要.....	i
第一章 绪 论.....	1
第一节 Hepcidin 研究进展	2
1.1 Hepcidin的分子生物学特征	2
1.2 Hepcidin的抗菌功能	5
1.3 Hepcidin 体外制备研究	6
第二节 分子内分子伴侣研究进展	9
2.1 分子内分子伴侣的发现和分类	9
2.2 分子内分子伴侣帮助蛋白质折叠的机制	10
2.3 分子内分子伴侣帮助蛋白质形成正确的二硫键	12
第三节 阳离子抗菌肽的抗菌机理	13
3.1 阳离子抗菌肽的结构决定抗菌活性	13
3.2 抗菌肽的抗菌机理	15
第四节 本研究的技术路线、目的和意义	19
4.1 技术路线	19
4.2 研究的目的和意义	19
第二章 大黄鱼、黑鲷和青鳉 Hepcidin 的化学合成、结构分析和抗菌活性研究.....	22
第一节 材料与方法	22

1.1 材料	22
1.2 方法	23
第二节 结果	26
2.1 大黄鱼、黑鲷和青鳉 Hecidin 基因序列分析	26
2.2 大黄鱼、黑鲷和青鳉 Hecidin成熟肽合成	30
2.3 大黄鱼、黑鲷和青鳉 Hecidin 的圆二色光谱	30
2.4 大黄鱼、黑鲷和青鳉 Hecidin 成熟肽MIC和MBC	32
2.5 大黄鱼、黑鲷和青鳉 Hecidin抗菌活性离子耐受性	34
2.6 大黄鱼、青鳉Hecidin抗菌活性的浓度相关性	35
2.7 大黄鱼Hecidin的杀菌动力学	36
第三节 讨论	38
3.1 PC-Hepc、OM-Hepc及AS-Hepc2 的抗菌活性	38
3.2 PC-Hepc、OM-Hepc及AS-Hepc2 是阳离子抗菌肽	39
3.3 PC-Hepc、OM-Hepc及AS-Hepc2为两亲、具有 β -折叠结构的分子	39
第四节 本章小结	41
 第三章 大黄鱼Pro-Hecidin的原核表达与抗菌活性	 42
第一节 材料与方法	42
1.1 材料	42
1.2 方法	46
第二节 结果	56
2.1 大黄鱼 PC-Pro-hepc 目的基因和 pET-28a+ 载体的制备和处理	56
2.2 重组表达载体 pET-N-PC-Pro-hepc 、 pET-C-PC-Pro-hepc 和 pET-PC-Pro-hepc的鉴定	57
2.3 重组质粒在大肠杆菌中的诱导表达	59
2.4 重组表达载体在大肠杆菌中的诱导表达条件的优化	60
2.5 重组表达载体的遗传稳定性	62

2.6 重组表达蛋白包涵体的洗涤	63
2.7 重组表达蛋白的复性和纯化	64
2.8 纯化后样品的脱盐和浓缩	65
2.9 纯化后 C-PC-Pro-hepc 表达产物的鉴定	67
2.10 N-PC-Pro-hepc, C-PC-Pro-hepc 和 PC-Pro-hepc 的圆二色谱	68
2.11 重组表达蛋白的抗菌活性	70
第三节 讨论	74
3.1 前导肽 Pro-region 在蛋白质折叠过程中的作用	74
3.2 重组表达蛋白的复性纯化	76
3.3 前导肽、His-Tag 对蛋白质表达量及其抗菌活性的影响	77
第四节 本章小结	79
 第四章 青鳉Hepcidin单个基因及串联基因的原核表达及其抗菌活性 .	80
第一节 材料与方法	80
1.1 材料	80
1.2 方法	80
第二节 结果	84
2.1 青鳉 OM-Pro-hepc 目的基因和 pET-28a+ 载体的制备和处理	85
2.2 重组表达载体pET-N-OM-Pro-hepc 和pET-OM-hepc-hepc 的鉴定	86
2.3 pET-N-OM-Pro-hepc 和 pET-OM-hepc-hepc 载体在大肠杆菌中的诱导表达	87
2.4 N-OM-Pro-hepc和OM-hepc-hepc 包涵体的洗涤	88
2.5 N-OM-Pro-hepc和 OM-hepc-hepc 表达产物的变性、复性和纯化	89
2.6 纯化后 N-OM-Pro-hepc 和 OM-hepc-hepc 的脱盐和浓缩	89
2.7 N-OM-Pro-hepc 和 OM-hepc-hepc 的圆二色光谱	91
2.8 N-OM-Pro-hepc 和 OM-hepc-hepc 的抗菌活性	92
第三节 讨论	96

3.1 N-OM-Pro-hepc 和 OM-hepc-hepc 的复性和纯化	96
3.2 N-OM-Pro-hepc 和 OM-hepc-hepc 的抗菌活性	97
3.3 链接肽 (Linker) 的设计	98
第四节 本章小结	98
第五章 大黄鱼Hepcidin多克隆抗体的制备与检测	100
第一节 材料和方法	100
1.1 材料	100
1.2 方法	103
第二节 结果	108
2.1 pTrc-CKS-PC-Hepc 原核表达载体的构建和鉴定	108
2.2 pTrc-CKS-PC-Hepc 重组质粒在大肠杆菌中的诱导表达	108
2.3 多克隆抗体的纯化	110
2.4 间接 ELISA 法测定抗体效价	111
2.5 Western-blot 检测蛋白	112
第三节 讨论	113
第四节 本章小结	115
第六章 鱼类抗菌肽 Hepcidin 抗菌机理研究	116
第一节 材料和方法	117
1.1 材料	117
1.2 方法	117
第二节 结果	119
2.1 光学显微镜观察蛋白作用后的腐皮镰孢孢子	119
2.2 扫描电镜观察与蛋白作用后的细菌和孢子	120
2.3 透射电镜观察与蛋白作用后的细菌和孢子	121
2.4 免疫荧光法定位蛋白与细菌的作用位点	128

2.5 DNA-Binding 实验	129
2.6 大黄鱼、青鳉、黑鲷 Hecidin 的三级结构	131
第三节 讨论	133
3.1 显微镜是研究抗菌机理的有力工具	133
3.2 Hecidin的杀菌机制	134
第四节 小结	137
第七章 结 语.....	138
第一节 研究成果	138
第二节 创新之处	140
第三节 研究展望	141
参考文献	142
在学期间参加的科研项目及成果.....	156
致 谢	158

CONTENTS

List of abbreviation.....	-1-
Abstract in Chinese.....	I
Abstract in English.....	i
 Chapter 1 Introduction.....	 1
Part 1 Development and progress in Hepcidin	2
1.1 Molecular biological characteristic of Hepcidin	2
1.2 Antimicrobial activity of Hepcidin	5
1.3 Preparation of Hepcidin in vitro	6
Part 2 Development and progress in intramolecular chaperone	9
2.1 Discovery and classification of intramolecular chaperone	9
2.2 Mechanisms of intramolecular chaperone modulate protein refolding....	10
2.3 Intramolecular chaperone facilitates protein disulfide formation....	12
Part 3 Antimicrobial mechanisms of cationic antimicrobial peptides.....	13
3.1 The relationship between	13
3.2 Mechanisms of antimicrobial activity	15
 Part4 Technical proposal, Aims and significance of this study	 19
4.1 Technical proposal	19
4.2 Aims and significance of this study	19
 Chapter 2 Antimicrobial activities and secondary structures of	

Hepcidins from three marine fish: <i>Pseudosciaena crocea</i> , <i>Oryzias melastigma</i> , and <i>Acanthopagrus schlegelii</i>	22
---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------	----

Part 1 Materials and methods	22
------------------------------------	----

1.1 Materials	22
---------------------	----

1.2 Methods	23
-------------------	----

Part 2 Results	26
----------------------	----

2.1 Analysis of Hepcidin sequences from the three marine fish	26
---------------------------------------------------------------------	----

2.2 Synthesis of the three mature peptides of Hepcidin	30
--------------------------------------------------------------	----

2.3 Circle dichromism spectrums of the three Hepcidin	30
-------------------------------------------------------------	----

2.4 MIC and MBC of the three Hepcidin	32
---------------------------------------------	----

2.5 Salt-sensitivity of antimicrobial activity of the three Hepcidin.....	34
---------------------------------------------------------------------------	----

2.6 Dose-sensitive studies of the three Hepcidin	35
--------------------------------------------------------	----

2.7 Killing kinetics of <i>Pseudosciaena crocea</i> Hepcidin	36
--------------------------------------------------------------------	----

Part 3 Discussion	38
-------------------------	----

3.1 Antimicrobial activity of PC-Hepc, OM-Hepc and AS-Hepc2	38
-------------------------------------------------------------------	----

3.2 PC-Hepc, OM-Hepc and AS-Hepc2 are cationic antimicrobial peptides....	39
---------------------------------------------------------------------------	----

3.3 PC-Hepc, OM-Hepc and AS-Hepc2 are amphipathic, disulphide-bonded molecules	
--------------------------------------------------------------------------------	--

30

Part 4 Summary	41
----------------------	----

Chapter 3 Expression, purification and antimicrobial activity of Prohepcidin from <i>Pseudosciaena crocea</i>	42
---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------	----

Part 1 Materials and methods	42
------------------------------------	----

1.1 Materials	41
---------------------	----

1.2 Methods	46
-------------------	----

Part 2 Results	56
----------------------	----

2.1 Preparation of pET-28a+ and PC-Pro-hepc fragments	56
2.2 Identification of the recombinant expression vectors pET-N-PC-Pro-hepc、 pET-C-PC-Pro-hepc and pET-PC-Pro-hepc	57
2.3 Expression of recombinant expression vectors in <i>E. coli</i>	58
2.4 Optimization of expression of recombinant vectors in <i>E. coli</i>	60
2.5 Plasmid stability of the recombinant vectors	62
2.6 Washing of the recombinant inclusion bodies	63
2.7 Refolding and purification of the recombinant proteins	64
2.8 Desalting and concentration of the recombinant proteins	65
2.9 Mass spectrometry analysis of C-PC-Pro-hepc	67
2.10 Circle dichromism spectrums of N-PC-Pro-hepc, C-PC-Pro-hepc and PC-Pro-hepc	68
2.11 Antimicrobial activity of the recombinant proteins	70
Part 3 Discussion	74
3.1 The role of Pro peptide in protein folding	74
3.2 Refolding and purification of the recombinant proteins	76
3.3 Effect of Pro peptide and His-Tag on expression and antimicrobial activity	77
Part 4 Summary	78
 Chapter 4 Expression and antimicrobial activity of one Hepcidin or two linked Hepcidins from <i>Oryzias melastigma</i>.....	 80
Part 1 Materials and methods	80
1.1 Materials	80
11.2 Methods	80
Part 2 Results	84
2.1 Preparation of pET-28a+ and OM-Pro-hepc fragments	85

2.2 Identification of the recombinant expression vectors pET-N-OM-Pro-hepc and pET-OM-hepc-hepc	86
2.3 Expression of N-OM-Pro-hepc and OM-hepc-hepc in <i>E. coli</i>	87
2.4 Washing of inclusion bodies of N-OM-Pro-hepc and OM-hepc-hepc	88
2.5 Denaturaion 、 refolding and purification of N-OM-Pro-hepc and OM-hepc-hepc.....	89
2.6 Desalting and concentration of N-OM-Pro-hepc and OM-hepc-hepc	89
2.7 Circle dichromism spectrums of N-OM-Pro-hepc and OM-hepc-hepc	91
2.8 Antimicrobial activity of N-OM-Pro-hepc and OM-hepc-hepc	92
Part 3 Discussion	96
3.1 Refolding and purification of N-OM-Pro-hepc and OM-hepc-hepc.....	96
3.2 Antimicrobial activity of N-OM-Pro-hepc and OM-hepc-hepc	97
3.3 Linker design	98
Part 4 Summary	98
 Chapter 5 Preparation and detection of polyclonal antibody against PC-Hepcidin.....	 100
Part 1 Materials and methods	100
1.1 Materials	100
1.2 Methods	103
Part 2 Results	108
2.1 Construction and identification of pTrc-CKS-PC-Hepc expression vector	108
2.2 Induction of recombinant vector pTrc- CKS-PC-Hepc in <i>E. coli</i> with IPTG	108
2.3 Purification of polyclonal antibody	110
2.4 Determination of titer of the antibody by indirect ELISA	111

2.5 Western-blot assay	112
Part 3 Discussion	113
Part 4 Summary	115

Chapter 6 Mechanisms of antimicrobial peptide activity of fish

Hepcidin	116
-----------------------	------------

Part 1 Materials and methods	117
-------------------------------------------	------------

1.1 Materials	117
---------------------	-----

1.2 Methods	117
-------------------	-----

Part 2 Results	114
-----------------------------	------------

2.1 Observation of <i>Fusarium solani</i> spores after incubation with Hepcidin using light microscope	119
--------------------------------------------------------------------------------------------------------------	-----

2.2 Observation of spores and bacteria after incubation with Hepcidin using scanning electron microscope	120
----------------------------------------------------------------------------------------------------------------	-----

2.3 Observation of spores and bacteria after incubation with Hepcidin using transmission electron microscope	121
--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------	-----

2.4 Observation of bacteria after incubation with Hepcidin using confocal microscopy.....	128
-------------------------------------------------------------------------------------------	-----

2.5 DNA-Binding assay	129
-----------------------------	-----

2.6 Prediction of tertiary structure of the three fish Hepcidin	131
-----------------------------------------------------------------------	-----

Part 3 Discussion.....	133
-------------------------------	------------

3.1 Microscope is an useful tool in studing antimicrobial mechanism....	133
-------------------------------------------------------------------------	-----

3.2 Mechanisms of antimicrobial peptide activity of Hepcidin	134
--------------------------------------------------------------------	-----

Part 4 Summary	137
-----------------------------	------------

Chapter 7 Summary.....	138
-------------------------------	------------

Part 1 Research findings	138
Part 2 Contributions	140
Part 3 Perspective	141
References	142
Research projects involved and achievements obtained in the period of doctoral degree study	156
Acknowledgements	158

缩略词中英文对照表

英文缩写	英文全称	中文全称
AMP	Antimicrobial peptide	抗菌肽
PC-Hepc	<i>Pseudosciaena crocea</i> Hepcidin	大黄鱼Hepcidin
OM-Hepc	<i>Oryzias melastigma</i> Hepcidin	青鳉Hepcidin
AS-Hepc2	<i>Acanthopagrus schlegelii</i> Hepcidin	黑鲷Hepcidin
ORF	Open reading frame	开放阅读框
CFU	Clonal formation unit	单克隆菌落形成单位
Da	Dalton	道尔顿
kDa	Kilodalton	千道尔顿
bp	Base pair	碱基对
dNTPs	Deoxyribonucleoside triphosphate	脱氧核糖核苷三磷酸
h	Hour	小时
LB	Luria Bertani medium	LB 培养基
pI	Isoelectric point	等电点
SDS	Sodium dodecyl sulfate	十二烷基硫酸钠
PAGE	Polyacrylamide gel electrophoresis	聚丙烯酰胺电泳
CD	Circle Dichromism	圆二色光谱
MIC	Minimal inhibitory concentration	最小抑菌浓度
MBC	Minimum bactericidal concentration	最小杀菌浓度
pH	Potentiometric hydrogen ion concentration	氢离子浓度指数
OD	Optical Density	光密度
g	Gram	克
ng	Nanogram	纳克
L	Liter	升
mL	Milliliter	毫升

缩略词中英文对照表

英文缩写	英文全称	中文全称
μ M	Micromolar	微摩尔
mM	Millimolar	毫摩尔
ESI-MS	Electrospray ionisation-mass spectrometry	电喷雾质谱
CGMCC no.	China General Microbiological Culture Collection number	中国普通微生物菌种保藏编号
IPTG	Isopropyl β -D-1-thiogalactopyranoside	异丙基- β -D-硫代半乳糖苷
Tris	Tris (hydroxymethyl)aminomethane	三羟甲基氨基甲烷
Gly	Glycine	甘氨酸
His	Histidine	组氨酸
Lys	Lysine	赖氨酸
Ile	Isoleucine	异亮氨酸
Val	Valine	缬氨酸
Thr	Threonine	苏氨酸
Gln	Glutamine	谷氨酰胺
Pro	Proline	脯氨酸
Ala	Alanine	丙氨酸
Arg	Arginine	精氨酸
Ser	Serine	丝氨酸
Phe	Phenylalanine	苯丙氨酸
Leu	Leucine	亮氨酸
Asp	Asparagine	天冬酰胺
Cys	Cysteine	半胱氨酸
BSA	Bovine serum albumin	牛血清白蛋白
BLAST	Basic Local Alignment Search Tool	基本局域联配搜寻工具
PCR	Polymerase chain reaction	聚合酶链反应

Degree papers are in the "[Xiamen University Electronic Theses and Dissertations Database](#)". Full texts are available in the following ways:

1. If your library is a CALIS member libraries, please log on <http://etd.calis.edu.cn/> and submit requests online, or consult the interlibrary loan department in your library.
2. For users of non-CALIS member libraries, please mail to etd@xmu.edu.cn for delivery details.

厦门大学博硕士论文摘要库